

## Die Bedeutung der Verknüpfungsposition des Adenosins im NAD<sup>+</sup> für die Coenzymaktivität gegenüber Lactatdehydrogenase

The Importance of the Position of the Adenosine Linkage in NAD<sup>+</sup> for Its Coenzyme Activity via Lactate Dehydrogenase

Eckhard Schlimme, Roland Mattern und Eberhard Schott

Laboratorium für Biologische Chemie im Fachgebiet Organische Chemie der Universität (GH), Warburger Straße 100, D-4790 Paderborn

Z. Naturforsch. 37c, 342–344 (1982); received October 28/December 9, 1981

NAD<sup>+</sup> Analogs, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>-(5'-β-nicotinamideribofuranosyl-3''-adenosyl)-diphosphate (N3''AD<sup>+</sup>), Lactate Dehydrogenase 4M-Isoenzyme

We report on the chemical preparation of the NAD<sup>+</sup> analog P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>-(5'-β-nicotinamideribofuranosyl-3''-adenosyl)-diphosphate (N3''AD<sup>+</sup>) by applying the 1,1'-carbonyldiimidazole activation method. The importance of how adenosine is linked to the nicotinamide mononucleotide phosphoribotide (NMNPR<sup>+</sup>) moiety is discussed with respect to the coenzyme activity in the lactate dehydrogenase catalyzed reaction.

### 1. Einleitung

Untersuchungen mit NAD<sup>+</sup>-Analoga haben die Bedeutung des Adenosinteils als hydrophobem Anker für die Erhaltung der Coenzymaktivität gezeigt [1–9]. Diese Arbeit berichtet über die Darstellung von P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>-(5'-β-Nicotinamidribofuranosyl-3''-adenosyl)-diphosphat (N3''AD<sup>+</sup>) und stellt den Einfluß der Verknüpfungsposition des Adenosins auf die Coenzymaktivität in der Lactatdehydrogenasereaktion durch Vergleiche mit den NAD<sup>+</sup>-Analoga Nicotinamid-α-adenindinucleotid (N $\alpha$ AD<sup>+</sup>) [8] und Nicotinamidmononucleotidphosphoribosid (NMNPR<sup>+</sup>) [1] heraus.

### 2. Experimentelles

#### 2.1 Methoden

Enzymatische Untersuchungen mit (a) L-Lactat:NAD<sup>+</sup> Oxidoreduktase [Lactatdehydrogenase

Sonderdruckanforderung: Prof. Dr. Dr. Eckhard Schlimme. 0341-0382/82/0300-0342 \$ 01.30/0

(LDH), 4M-Isoenzym aus Schweinemuskel, E.C. 1.1.1.27], (b) Orthophosphorsäuremonoesterphosphohydrolase [Alkalische Phosphatase (APase), E.C. 3.1.2.1], (c) Oligonucleotid-5'-nucleotidhydrolase [Phosphodiesterase (PDEase I, Schlangengift), E.C. 3.1.4.1] und (d) Oligonucleotid-3'-nucleotidhydrolase [Phosphodiesterase (PDEase II, Kalbsmilz), E.C. 3.1.3.18] wie in [8, 10] beschrieben. Sämtliche Enzyme wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Chromatographie: Die Säulenchromatographie wurde mit DEAE-Cellulose, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form, (Fa. Whatman) durchgeführt. Für die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden folgende Trägerfolien verwendet: (a) Polyethylenimin-imprägnierte Cellulosefolien F 1440 PEI 254 für LS I und II sowie (b) Cellulosefolien F 1440 LS 254 (Fa. Schleicher und Schüll, Dassel) für LS III. Als Lösungsmittelsysteme (LS) für die DC wurden eingesetzt: LS I = 0.5 M KNO<sub>3</sub> (pH 5.5); LS II = 0.25 M LiCl (pH 5.0); LS III = Ethanol/1 M Ammoniumacetat (7:3, V:V) (pH 6.8). Flüssigkeitschromatographie (HPLC): Die Retentionszeiten, R<sub>t</sub> [min], wurden mit einem programmgesteuerten Altex-Kontron-Hochleistungsflüssigkeitschromatographen ermittelt. Eine detaillierte Beschreibung dieses HPLC-Systems erfolgt an anderer Stelle [11].

Die Dünnschichtelektrophorese wurde wie in [8] beschrieben ausgeführt.

### 2.2 Chemische Synthesen

(a) P<sup>1</sup>,P<sup>2</sup>-(5'-β-Nicotinamidribofuranosyl-3''-adenosyl)-diphosphat (N3''AD<sup>+</sup>, Abb. 1) wurde durch Anwendung der Imidazolidaktivierungsmethode [12–15] aus 3'AMP und NMN<sup>+</sup> erhalten. 40 μmol 3'AMP wurden über das Pyridinium- in das Tri-n-octylammonium-Salz überführt und über 24 Std. mit 200 μmol 1,1'-Carbonyldiimidazol in 4 ml DMF aktiviert. Anschließend wurde überschüssiges Aktivierungsreagens mit Methanol zerstört und das aktivierte 3'AMP mit 80 μmol des in 5 ml DMF gelösten Tri-n-octylammonium-Salzes von NMN<sup>+</sup> kondensiert (4 Tage bei RT). Der Reaktionsansatz wurde säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose mit Triethylammoniumbicarbonat (TBK)-Puffer, pH 7,5 (0–0,4 M) als Elutionsmittel aufgetrennt. Außer N3''AD<sup>+</sup>, Elution bei 0,18 M TBK, entstand bei der Kondensation auch P<sup>1</sup>,P<sup>2</sup>-(Bis-3',3''-adenosyl)-diphosphat (3',3''Ap<sub>2</sub>A), Elution bei 0,23 M TBK. Aus-



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

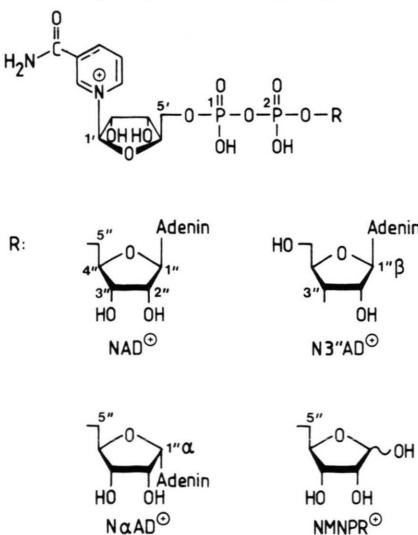
On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

beute (bezogen auf 3'AMP): 5% N3''AD<sup>+</sup>, 39% 3',3''Ap<sub>2</sub>A.

Die Charakterisierung von N3''AD<sup>+</sup> gelang enzymatisch und spektroskopisch. Im UV-Spektrum zeigte N3''AD<sup>+</sup> nach Zugabe von KCN ein für den Nicotinamidribosidteil des Coenzymanalogs typisches Maximum des Cyanidadduktes ( $\lambda_{\text{max}} = 326 \text{ nm}$ ) neben der Absorption des Adeninringes ( $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ ). Ferner konnte auch ein Nitrataddukt von NAD<sup>+</sup> wie von N3''AD<sup>+</sup> ( $\lambda_{\text{max}} = 302 \text{ nm}$ ) erhalten werden. Das Spaltungsverhalten gegenüber Alkalischer Phosphatase (APase) und Phosphodiesterasen aus Schlangengift (PDEase I) und Kalbsmilz (PDEase II) und die dabei entstandenen Spaltungsprodukte beweisen, daß einmal eine Diphosphatbrücke und zum anderen eine 3''-Verknüpfung des Adenosins vorliegen (Tabelle 1).

(b) P<sup>1</sup>,P<sup>2</sup>-(5'-β-Nicotinamidribofuranosyl-5''-α-adenosyl)-diphosphat (Nicotinamid-α-adenindinucleotid, NαAD<sup>+</sup>, Abb. 1) wurde wie beschrieben [8] nach der Methode von Todd [16] dargestellt.

Mit den synthetisierten Analoga N3''AD<sup>+</sup> und NαAD<sup>+</sup> wurden folgende enzymatische Spalt- und Abbauprodukte erhalten DC: ( $R_f$  in LS I) 5'AMP (0,22), 3'AMP (0,62) Adenosin (0,50); ( $R_f$  in LS II; LS III) NAD<sup>+</sup> (0,55; 0,08), N3''AD<sup>+</sup> (0,51; 0,07), NαAD<sup>+</sup> (0,54; 0,08), NMN<sup>+</sup> (0,68; 0,08), 5'AMP (0,09; 0,07), 3'AMP (0,09; 0,08), 5'-αAMP (0,11; 0,07), Adenosin (0,57; 0,56), α-Adenosin (0,59; 0,55). Elektrophoretische Mobilität: NAD<sup>+</sup> (+ 1,0), N3''AD<sup>+</sup> (+ 0,4). HPLC: ( $R_t$  [min]) Nicotinamidribosid (0,65), Adenosin (0,91), NMN<sup>+</sup> (1,35), NAD<sup>+</sup> (2,79), 5'AMP (3,28), N3''AD<sup>+</sup> (3,64), 3'AMP (3,88).



Tab. I. Spaltungsverhalten von NAD<sup>+</sup>, N3''AD<sup>+</sup> und NαAD<sup>+</sup>

Substrat	Enzym APase	PDEase I	Spaltprodukte	PDEase II	Spaltprodukte
NAD <sup>+</sup>	-	+	NMN <sup>+</sup> 5'AMP	-	-
N3''AD <sup>+</sup>	-	+	NMN <sup>+</sup> 3'AMP	+	NMN <sup>+</sup> 3'AMP
NαAD <sup>+</sup>	-	+	NMN <sup>+</sup>	-	-

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die biologische Aktivität der Coenzymanaloga wurde in der (4M)LDH-katalysierten Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat untersucht. Wird NAD<sup>+</sup> durch NαAD<sup>+</sup> in der LDH-Reaktion ersetzt, so sinkt die katalytische Aktivität zwar auf etwa 35 Prozent gegenüber der des NAD<sup>+</sup> (Wechselzahl = 35.500 mol<sup>-1</sup> NAD<sup>+</sup> × min<sup>-1</sup> × mol<sup>-1</sup> LDH) [8]. Die Anomerisierung am C1' des Adenosins bedingt gleichzeitig eine etwa 5fache Erhöhung des  $K_m$ -Wertes von NαAD<sup>+</sup> gegenüber dem natürlichen Coenzym ( $K_m = 0,27 \text{ mmol} \times 1^{-1}$ ) [8]. N3''AD<sup>+</sup> wird dagegen in der (4M)LDH-Reaktion weder reduziert, noch kann dieses Analogon, z. B. bei äquimolarer Zugabe im Bereich der  $K_m$ -Konzentration, die Coenzymaktivität des NAD<sup>+</sup> hemmen.

NAD<sup>+</sup> besteht aus dem Adenosin als Effektorteil (A-Teil), der mit dem am Hydridtransfer beteiligten Nicotinamidribosid, dem Cosubstratteil (N-Teil), über eine 5',5'Diphosphatbrücke verknüpft ist. Der Diphosphatteil wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Arginin- und Lysinseitenketten (arg 101, lys 58) der LDH [17, 18] im Coenzymbindungszentrum fixiert. Dadurch wird der Bindungsbereich für den A-Teil des Coenzyms eingegrenzt. Bei der im N3''AD<sup>+</sup> vorliegenden unnatürlichen 3''-Verknüpfung des Adenosins mit dem Diphosphatteil des Coenzyms liegt das Adenosin räumlich „außerhalb“ der Effektorbindungsstelle. N3''AD<sup>+</sup> verhält sich deshalb wie ein NAD<sup>+</sup>-Analogon ohne „hydrophoben Anker“, so daß die Hydridübertragungsreaktion der LDH von N3''AD<sup>+</sup> ebensowenig „moduliert“ werden kann wie durch NMNPR<sup>+</sup> [1]. Das Coenzym kann die katalytische Aktivität der LDH nur dann anschalten, wenn sowohl der N- als auch der A-Teil in die Coenzymbindungsstelle passen und da-

durch Wechselwirkungen über bestimmte Aminosäureseitenketten (tyr 85, asp 53, gly 30) [17, 18] möglich werden.

Diese Wechselbeziehungen entfallen, wenn der Adenosinrest wie im NMNPR<sup>+</sup> fehlt oder aus der nativen 5'- in die unnatürliche 3''-Position transferiert wurde. Sie bleiben dagegen im N $\alpha$ AD<sup>+</sup> erhalten, da der Adeninring in diesem Analogon eine NAD<sup>+</sup>-äquivalente Position durch Änderung des Torsionswinkels C4''-C5''-O5''-P2 einstellen kann

[8], ohne daß die Stellung der intramolekularen Diophosphatbrücke und des N-Teils verändert wird.

### Danksagung

Dr. K. S. Boos und Dipl.-Ing. S. Bornemann danken wir für wertvolle Diskussionen und dem Land Nordrhein-Westfalen sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

- [1] G. Pfleiderer, E. Sann und F. Ortanderl, Biochim. Biophys. Acta **73**, 39–49 (1963).
- [2] C. Woenckhaus und D. Scherr, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 53–59 (1973).
- [3] C. Woenckhaus und G. Pfleiderer, Biochem. Z. **341**, 495–501 (1965).
- [4] C. Woenckhaus und P. Zumpe, Z. Naturforsch. **23b**, 484–490 (1968).
- [5] C. Woenckhaus und D. Scherr, Z. Naturforsch. **26b**, 106–112 (1971).
- [6] C. Woenckhaus und M. H. Volz, Chem. Ber. **99**, 1712–1717 (1966).
- [7] H. Vutz, R. Koog, R. Jeck und C. Woenckhaus, Liebigs Ann. Chem. **1980**, 1259–1270.
- [8] E. Schott und E. Schlimme, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 1675–1680 (1978).
- [9a] E. Schott, Dissertation, Universität (GH) Paderborn (1980).
- [9b] E. Schlimme und E. Schott, „Biologische Funktion chemisch modifizierter Nucleotide dargestellt am Beispiel ADP-modifizierter NAD-Analoga“. Forschungsbericht Nr. 3039 des Landes Nordrhein-Westfalen; Westdeutscher Verlag Opladen (1981).
- [9c] R. Mattern, Diplomarbeit, Universität (GH) Paderborn (1981).
- [10] S. Bornemann und E. Schlimme, Z. Naturforsch. **35c**, 57–64 (1980).
- [11] E. Hagemeier, S. Bornemann, K. S. Boos und E. Schlimme, J. Chromatogr. **237**, 178–182 (1982).
- [12] H. A. Staab, Liebigs Ann. Chem. **609**, 75–88 (1957).
- [13] F. Cramer, H. Schaller und H. A. Staab, Chem. Ber. **94**, 1612–1621 und 1621–1633 (1961).
- [14] D. E. Hoard und D. G. Ott, J. Am. Chem. Soc. **87**, 1785–1788 (1965).
- [15] K. S. Boos, Dissertation, Techn. Univ. Hannover (1977).
- [16] N. A. Hughes, G. W. Kenner und A. Todd, J. Chem. Soc. London **1957**, 3733–3738.
- [17] J. J. Holbrook, A. Liljas, S. J. Steindel und M. G. Rossmann, The Enzymes **11**, Oxidation – Reduction (P. D. Boyer, ed.) S. 191–292, Acad. Press, New York 1975.
- [18] W. Eventoff, M. G. Rossmann, S. S. Taylor, H. J. Torff, H. Meyer, W. Keil und H. H. Kiltz, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **74**, 2677–2681 (1977).